ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 N° 44

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DÉPISTAGE DE LA BRUCELLOSE BOVINE PAR L'ÉPREUVE DE L'ANNEAU

THÈSE

pour le doctorat vétérinaire

(Diplôme d'Etat)

présentée et soutenue publiquement en Mai 1972

devant

l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

PAR

DELEPOULLE Charles, Henri

Né le 4 Mai 1945, à MOUVAUX (Nord)

JURY :

Président : Mme ENJALBERT, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs : M. SAURAT, Professeur à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

M. LAUTIE, Professeur à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DÉPISTAGE DE LA BRUCELLOSE BOVINE PAR L'ÉPREUVE DE L'ANNEAU

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 N° 44

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DÉPISTAGE DE LA BRUCELLOSE BOVINE PAR L'ÉPREUVE DE L'ANNEAU

THÈSE

pour le doctorat vétérinaire

(Diplôme d'Etat)

présentée et soutenue publiquement en Mai 1972

devant

l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

PAR

DELEPOULLE Charles, Henri

Né le 4 Mai 1945, à MOUVAUX (Nord)

JURY :
- Président : Mme ENJALBERT, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
- Assesseurs : M. SAURAT, Professeur à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse
- Assesseurs : M. LAUTIE, Professeur à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

IMPRIMERIE Emile VICQ - 61 - FLERS - 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. FLORIO
Directeurs Honoraires ..... M. PONS
M. DARRASPEN
Professeur Honoraire ..... M. LOMBARD

PERSONNEL ENSEIGNANT

Chaire de Pharmacie et Toxicologie

— Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
— Maître-Assistant ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

Chaire de Physique et Chimie Biologiques et Médicales

— Professeur titulaire ..... M. RICO

Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale

Chaire d'Anatomie des Animaux Domestiques

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX

Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

Chaire de Physiologie et Thérapeutique

— Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
— Maître de Conférences, Non Chef de Service ..... M. FARGEAS

Physiologie - Thérapeutique et Pharmacodynamie

Chaire d'Histologie — Anatomie Pathologique

— Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
— Professeur sans Chaire ..... M. CABANIE
— Maître-Assistant ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique

Chaire d'Hygiène et Industrie des Aliments d'Origine Animale

— Professeur titulaire ..... M. LABIE
— Maître-Assistant ..... M. EECKHOUTTE

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie
des denrées alimentaires d'origine animale

Chaire de Parasitologie et Maladies Parasitaires

— Professeur titulaire ..... M. BRIZARD
— Maître-Assistant Agrégé ..... M. DORCHIES

Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

Chaire de Sémiologie et Pathologie Médicale des Equides et Carnivores

— Professeur titulaire ..... M. FLORIO
— Professeur sans Chaire ..... M. LESCURE
— Maître-Assistant ..... M. GUELFI

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et déontologie - Clinique

Chaire de Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de Basse-Cour

— Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
— Professeur sans Chaire ..... M. ESPINASSE
— Maître-Assistant ..... M. BEZILLE

Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de Basse-Cour
Clinique - Clinique ambulatoire

Chaire de Pathologie Chirurgicale

— Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale
Technique Chirurgicale - Pathologie Chirurgicale

Chaire de Pathologie de la Reproduction

— Professeur titulaire ..... M. BERTHELON
— Professeur sans Chaire ..... M. ROYAL

Sémiologie et propédeutique - Pathologie de la Reproduction
Obstétrique - Clinique

Chaire de Maladies Contagieuses — Zoonoses — Législation Sanitaire

— Professeur titulaire ..... M. SAURAT
— Maître-Assistant Agrégé ..... M. CHANTAL

Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

Chaire de Pathologie Générale - Microbiologie - Immunologie

— Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
— Maître-Assistant ..... M. MEIGNIER

Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale

Chaire de Zootechnie et Economie Rurale

— Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
— Maître-Assistant ..... M. DARRE

Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène Générale
Zootechnie - Elevage - Economie Générale et des productions animales

Chaire d'Alimentation

— Professeur titulaire ..... M. FALIU
— Maître de Conférences, Non Chef de Service ..... M. GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie - Agronomie
Alimentation

COURS COMPLÉMENTAIRES – CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies Infectieuses ...	M. MONNIER
Aspect médical des Zoonoses	M. ARMENGAUD
Energétique	M. LABOUCHE
Initiation à l'Informatique Biomédicale ...	M. FERNET
Agronomie	M. COMBRET
Métabolismes	M. RAYNAUD

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats. (Délibération de la Faculté en date du 10 Mai 1891, et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 Juin 1924).

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A notre Président de Thèse :

MADAME LE PROFESSEUR ENJALBERT

de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter
la Présidence de notre jury de Thèse.
Hommages respectueux.

A notre Jury de Thèse :

MONSIEUR LE PROFESSEUR SAURAT
de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui a accepté de nous laisser toute liberté dans la réalisation de ce travail.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR LAUTIE
de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse
Chevalier de l'Ordre National du Mérite

Que nous remercions d'avoir bien voulu être notre Assesseur.

Hommages respectueux.

AU DOCTEUR MAURICE CAMY

Ex-Directeur du Laboratoire de la Direction des Services Vétérinaires du Tarn

Directeur des Abattoirs Municipaux de Toulouse

Dont les conseils bienveillants ont guidé notre étude.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre gratitude et de notre grande admiration pour son dévouement.

AU PERSONNEL DU LABORATOIRE DE LA DIRECTION

DES SERVICES VÉTÉRINAIRES DU TARN

En témoignage de nos remerciements.

INTRODUCTION

Alors que le dépistage de la brucellose par l'épreuve de l'anneau, ou Ring Test, connaît ses prémices dans notre pays, il nous a paru opportun, de contribuer dans la limite de nos possibilités, à l'étude de cette méthode de diagnostic.

Nous nous sommes proposé, à la faveur de recherches personnelles d'en établir la valeur, et d'en définir les limites en tant qu'épreuve collective et individuelle.

Les données relatives à la maladie, les principes généraux du Ring Test et une expérimentation constituent les trois chapitres de notre travail.

PLAN

I. – GÉNÉRALITÉS – RAPPEL SUR LA BRUCELLOSE.

A) Définition.

B) Importance.

C) Bases légales de la lutte contre la brucellose.

D) Diagnostic :

a) mise en évidence du germe
- prélèvements
- bactérioscopie
- cultures
- inoculation

b) mise en évidence des anticorps

1°) Séro agglutinations
- lentes en tubes
- rapide sur lame

2°) Déviation du complément
- technique
- lecture
- critique

3°) Réaction à l'antiglobuline ou test de COOMBS
- technique
- critique

4°) Autres épreuves sérologiques
- test de l'anneau ou Ring Test
- lacto-séroagglutination
- muco et spermo agglutination

c) allergie spécifique

II.– L'ÉPREUVE DE L'ANNEAU – GÉNÉRALITÉS.

A) Définition

B) Historique

C) Bases légales

D) Techniques :
- prélèvements
- protocole
- lecture

E) Mécanisme du Ring Test

F) Intérêt du Ring Test
- avantages
- inconvénients

III. – EXPÉRIMENTATION.

A) Protocole d'action
1°) Prélèvements
2°) Epreuves de laboratoire

B) Techniques
1°) Séro agglutination
2°) Ring Test
a) l'antigène coloré
b) manipulations sur les laits
c) Ring Test sur le sérum

C) Résultats

1°) Étude du Ring Test collectif

— Interprétation des tableaux numéros 1 et 2

— Conclusions

2°) Étude du Ring Test individuel

— Interprétation des tableaux numéros 3 et 4

— Conclusions

3°) Étude du Ring Test sérum

— Interprétation du tableau numéro 5

— Conclusions

IV. — CONCLUSION GÉNÉRALE.

GÉNÉRALITÉS
RAPPELS SUR LA BRUCELLOSE

A.— DÉFINITION.

La brucellose est une maladie légalement contagieuse, infectieuse, virulente, inoculable, transmissible à l'homme et aux animaux. Elle est due aux sérotypes spécifiques du genre brucella. Son évolution est lente, et ses manifestations cliniques affectent l'appareil génital (avortements, rétentions placentaires, métrites, mammites, stérilités chez la femelle, orchites chez le mâle) et les articulations (arthrites, bursites).

B.— IMPORTANCE.

Elle est d'ordre médical, économique et hygiénique.

a) médicale :

— la mortalité est en principe nulle : après la phase aiguë de la maladie, s'installent des lésions chroniques de la sphère génitale ou des articulations.

— cependant la morbidité va croissant au fil des années (15 % de l'effectif bovin en 1960, 20 % en 1967, et des pointes de 30 à 40 % dans certains départements (Pilet Ch. et Bourdon J.L.), car, aux infectés cliniques, il faut ajouter les infectés latents plus nombreux encore.

— enfin, la contagiosité des malades assure en l'absence de mesures sanitaires efficaces, l'extension géographique et la dissémination zoologique de l'infection.

b) économique :

les pertes dues à la maladie sont considérables ; les veaux morts - nés, les lactations perdues, les réformes prématurées de vaches devenues stériles, coûtent chaque année 400 à 600.000.000 de francs, soient 2 % de notre production de viande et de lait.

En outre, la Communauté Economique Européenne dresse un obstacle sanitaire à l'exportation de nos animaux et de leurs produits.

c) hygiénique :

la brucellose est une anthropozoonose, connue sous le nom de «Fièvre de Malte», «Fièvre Ondulante», «Brucellose Humaine».

La contamination se fait par contact, inhalation, ingestion et inoculation.

— Les conditions de contact direct avec le malade ou ses produits pathologiques sont réalisées dans l'exercice de certaines professions : c'est donc une maladie professionnelle dont les victimes sont les éleveurs, les vétérinaires, le personnel des industries du lait ou de la viande, le personnel des laboratoires.

— L'ingestion de denrées contaminées transmet la maladie et l'on ne saurait trop insister sur ce mode d'infection sachant que la plupart des vaches infectées éliminent des brucelles par le lait.

L'on compte chaque année en France 8 à 10.000 cas de brucellose humaine.

C. — BASES LÉGALES DE LA LUTTE CONTRE LA BRUCELLOSE

Cette triple menace a suscité par sa gravité l'élaboration d'un plan de lutte contre la brucellose.

a) elle a pour objet :

— L'assainissement des effectifs infectés
— La protection des effectifs indemnes ou assainis

dans les espèces bovine, caprine et ovine.

b) deux décrets et deux arrêtés ministériels lui donnent ses bases légales :

— Un règlement de police sanitaire sanctionne les formes réputées contagieuses de la maladie, confirmées par un examen bactériologique.

— Un programme de prophylaxie collective assure le dépistage des infectés latents et le contrôle des exploitations par des examens tels que :

- La séroagglutination de WRIGHT et la déviation du complément qui sont des épreuves de diagnostic individuel portant sur le sang.

- L'épreuve de l'anneau ou Ring Test qui est une méthode de diagnostic de groupe sur le lait de mélange de 8 vaches au maximum.

— Enfin, une réglementation de la vaccination, et le contrôle sanitaire des animaux introduits dans les effectifs sains, complètent ces mesures.

Difficultés : Outre les difficultés psychologiques, qui consistent à faire admettre aux éleveurs le principe d'une prophylaxie encore facultative, il s'agit de donner une signification indiscutable aux résultats des épreuves sérologiques.

Or, des interférences vaccinales très nombreuses, résultant d'un emploi abusif de la souche B 19 au cours des dix dernières années, et le choix arbitraire d'un seuil de positivité dans les épreuves sérologiques rendent parfois le diagnostic équivoque.

D.— DIAGNOSTIC.

Il est avant tout expérimental. Car, si la clinique et l'épizootiologie fournissent de fortes présomptions, seul le secours du laboratoire peut apporter une certitude.

Le diagnostic expérimental repose sur la mise en évidence du germe lui-même, ou sur celle des anticorps spécifiques témoins de sa présence au sein d'un organisme.

a) Mise en évidence du germe :

Elle assure le diagnostic des formes légalement contagieuses.

— Prélèvements :

L'appareil génital élabore à lui seul la plupart des matières virulentes. Dans la pratique, fœtus et enveloppes représentent la majeure partie des prélèvements envoyés par les vétérinaires praticiens au titre de la police sanitaire. Il s'agit le plus souvent de houppes cotylédonaires altérées ou d'organes fœtaux (estomac, rate, poumon, os long).

Cependant, mucus vaginal, lait, sperme ou toute sécrétion peuvent servir au diagnostic bactériologique de la maladie.

— Bactérioscopie :

- Colorations différentielles : elles sont basées sur le caractère acido-résistant du germe. Les colorations de STAMP ou de KOSTER

font apparaître les brucelles en rouge sur fond bleu dans les frottis positifs.

Cependant cette méthode manque de spécificité car d'autres bacilles prennent le colorant.

En outre certaines formes de brucella non acido-résistantes échappent à l'examen.

- Immunofluorescence : Cette méthode due à COONS consiste à marquer, à l'aide d'un fluorochrome les anticorps spécifiques contenus dans un sérum. Les frottis pathologiques à examiner sont mis sur lame en présence d'un tel sérum marqué. Lors de réaction positive, on observe au microscope, en lumière ultra-violette, des îlots de fluorescence verte, témoins de la formation de complexes anticorps-antigène marqués.

C'est une technique simple et rapide dont les résultats concordent toujours avec ceux de la culture.

— Cultures :

L'isolement des cultures de brucella exige des milieux sélectifs qui inhibent le développement de germes adventices ; on utilise en général le milieu WE (gélose additionnée de Polymixine B, Bacitracine, Actidione et coloré par le violet d'Ethyle).

On pratique deux ensemencements, l'un sous atmosphère normale, l'autre sous atmosphère enrichie de 10 % d'anhydride carbonique ; en 3 à 5 jours apparaissent les colonies.

Si cette méthode est plus longue et délicate, elle est aussi plus sûre, et l'isolement d'une colonie associé à une bactérioscopie positive permet de poser le diagnostic de brucellose avec certitude.

— Inoculations :

L'épreuve est pratiquée sur le cobaye qui se révèle très sensible. Deux animaux sont inoculés par voie sous cutanée, dermique ou conjonctivale, pour chaque examen.

Trois semaines après, ils font l'objet d'une SAW et d'une épreuve allergique. Si les résultats sont positifs, les animaux sont sacrifiés et l'on pratique des ensemencements à partir des organes lésés ou des ganglions. Cette méthode permet l'isolement du germe en culture pure dans un délai de 30 jours.

Elle est donc sûre, mais longue et onéreuse.

b) Mise en évidence des anticorps :

La présence d'antigènes brucelliques au sein d'un organisme animal induit chez celui-ci l'élaboration de divers anticorps spécifiques que l'on retrouve dans le sang, le lait, le mucus vaginal, le sperme ou tout exsudat pathologique.

De nombreuses épreuves sérologiques permettent de les révéler.

Nous nous bornerons à citer les principales :

1 — Séro-agglutinations :

Elles mettent en évidence les agglutinines sanguines.

— Lente en tubes : séro agglutination de WRIGHT (SAW)

C'est la méthode de référence en matière de dépistage brucellique. Elle consiste à mélanger dans une série de tubes une même quantité de sérum à éprouver à des dilutions progressivement croissantes, à une quantité égale d'antigène brucellique.

La lecture s'effectue après un séjour de 18 heures à l'étuve à 37° C. Elle est basée sur la densité optique du liquide surnageant. Cette épreuve connaît des défaillances.

- Le phénomène de zone ou agglutination paraxodale qui se traduit par l'absence d'agglutination dans certains tubes de la galerie, alors qu'elle se produit dans ceux où la dilution du sérum est plus élevée. L'emploi d'eau salée à 5 % au lieu de sérum physiologique pour effectuer les dilutions, ou le chauffage du sérum à 56° C, déjouent en partie ce phénomène.

- la présence d'anticorps incomplets monovalents, qui est sans doute une manifestation du phénomène précédent, est révélée par l'épreuve à l'antiglobuline (Réaction de COOMBS).

- En outre, on observe :

des défaillances persistantes comme l'absence d'anticorps circulants chez certains animaux,

des défaillances temporaires, telles qu'une apparition tardive ou fugace des agglutinines dont le taux sérique subit de grandes fluctuations.

- Dans l'autre sens la séro agglutination peut manquer de spécificité et révéler des agglutinines autres que brucelliques :

telles les coagglutinines dont la synthèse est induite par des germes autres que brucella mais ayant un facteur antigénique commun avec celle-ci.

telles les agglutinines non spécifiques, substances protéiques chimiquement voisines des anticorps spécifiques.

- Par ailleurs dans sa technique classique, la SAW ne fait pas la distinction entre les agglutinines infectieuses et les agglutinines post-vaccinales.

Une réaction douteuse ou négative isolée de la SAW ne peut jamais permettre d'infirmer l'absence de brucellose chez un animal.

L'épreuve prend toute sa signification quand elle s'applique à des effectifs entiers.

— Rapide sur lame : réaction d'HUDDLESON.

Elle consiste à mélanger une goutte de sérum à étudier et une goutte d'antigène brucellique coloré.

On observe à la lunette binoculaire la formation d'agglutinats dans les minutes suivantes, s'il s'agit d'un sérum positif.

C'est une épreuve simple et rapide, mais peu fidèle.

2 — Déviation du complément :

Cette épreuve révèle les sensibilisatrices du sérum.

Elle est préconisée pour tester les sérums suspects au séro diagnostic de WRIGHT (CM du 1er Juin 1966).

— Technique :

Le sérum à étudier, chauffé à 56° C, progressivement dilué est réparti dans une série de tubes où sont ajoutés l'antigène brucellique, puis le complément titré, et enfin un couple hémolytique (hématies de mouton et sérum anti chauffé à 56 ° C.)

Dans la technique à froid, de type KOLMER, la fixation s'effectue à + 4° C pendant 12 heures puis 10 minutes à 37° C.

— Lecture :

Si le sérum est positif, le complexe antigène-sensibilisatrice se forme et fixe le complément ; le couple hémolytique privé de ce dernier ne peut réagir.

Si le sérum est négatif le complément reste libre et sert à l'hémolyse du couple.

— Critique :

Cette méthode est plus spécifique que la SAW et jusqu'à présent, on n'a pas relaté de fausses réactions ; cependant elle peut être négative pour des sérums provenant d'animaux infectés, mais moins souvent que la SAW.

3 — Réaction à l'antiglobuline ou test de COOMBS :

Comme la précédente cette méthode doit servir à éprouver les sérums qui ont donné un résultat douteux au séro diagnostic de WRIGHT (CM du 6 Juin 1964).

Elle met en évidence les anticorps agglutinants incomplets ou bloquants contenus dans les sérums d'animaux malades.

Ces anticorps monovalents sont saturés par l'antigène brucellique et chaque complexe réalisé reste isolé. Seule une antiglobuline spécifique permet de les réunir en agglutinats macroscopiques.

— Technique :

Ces anticorps étant thermostables, pour ne conserver qu'eux, les sérums à tester, dilués au 1/5^{e} sont chauffés pendant 10 minutes à 69 - 69,5° C. On leur ajoute alors l'antigène brucellique, puis le sérum antiglobuline ou l'antisérum d'espèce correspondant.

— Critique :

Cette épreuve permet de distinguer les anticorps brucelliques vrais, des anticorps non spécifiques présents à faible titre dans les sérums et révélés par la SAW.

Si des animaux fortement suspects de brucellose ont néanmoins donné des résultats négatifs aux épreuves sérologiques classiques (SAW et déviation du complément), on aura recours au test de COOMBS.

4 — Autres épreuves sérologiques :

Lait ou lactosérum, mucus vaginal, sperme constituent le matériel d'étude.

— Ring Test ou test de l'anneau :

Il permet d'établir un diagnostic collectif, portant sur le lait de mélange de plusieurs femelles. Nous ne ferons que le citer, notre propos étant d'en discuter la valeur et la portée dans le dépistage de la maladie.

— Lacto séro agglutination :

Elle se pratique comme la SAW, la recherche des agglutinines se faisant sur le lacto sérum au lieu du sang.

Peu usitée, elle permettrait une différenciation entre les anticorps vaccinaux et pathologiques, les premiers disparaissant avant le troisième mois suivant l'intervention vaccinale.

— Muco agglutination et spermoagglutination :

Le mucus vaginal ou le sperme sont centrifugés. On réalise avec le surnageant une agglutination selon le même protocole que la SAW.

c) Allergie spécifique :

Un animal en contact avec brucella acquiert une hypersensibilité vis-à-vis des allergènes brucelliques (extraits de culture ou filtrats tels que mélitine ou abortine).

Leur injection intradermique au pli sous caudal provoque chez l'animal une réaction locale, focale, et générale.

Cette réaction ne peut être utilisée qu'au titre de dépistage collectif, car ses nombreuses défaillances limitent son interprétation en tant que diagnostic individuel, surtout dans l'espèce bovine.

L'ÉPREUVE DE L'ANNEAU
GÉNÉRALITÉS

A.– DÉFINITION :

Le test de l'anneau ou Ring Test est une méthode de diagnostic immunologique qui révèle la présence d'agglutinines spécifiques dans le lait de vaches infectées de brucellose, par addition de l'antigène coloré correspondant.

B. – HISTORIQUE :

En 1937, FLEISCHHAUER s'inspirant de la technique de SCHERN et GORLI utilise un antigène brucellique coloré à l'hémotoxyline. L'addition d'une goutte de cet antigène à des laits de vaches brucelliques fait apparaître un anneau coloré en violet, à la partie supérieure des tubes, le lait sous jacent reprenant plus ou moins sa couleur naturelle ; il donne à sa méthode le nom d'Abortus Bang Ringprobe (A.B.R.).

En 1943, les Suédois NORELL et OLSEN, et les Danois WINTHER et HANSEN, SEITH et JORGENSEN, BRUHN en confirment la valeur. Dans les années suivantes, l'épreuve est utilisée au Danemark pour l'enregistrement des troupeaux indemnes et le contrôle trimestriel des troupeaux sains.

Puis les Américains ROEPKE et coll. HUDDLESON et CARILLO, DAVENPORT, BREMER, HAMILTON et HARDY, le Canadien MOORE, l'Africain du Sud, VON DRIMMELEN, publient les résultats de leurs recherches.

Le Brésil détermine «la distribution de la brucellose bovine» sur son territoire par le Ring Test.

En 1950, l'O.I.E. propose d'entreprendre une série de travaux destinés à standardiser la méthode.

En 1952 ROSSI en France publie ses travaux concernant l'utilisation de l'épreuve dans son département (Saône et Loire).

En 1953 SENTHILLE applique le Ring Test dans le dépistage de la brucellose dans le département de l'Orne.

En 1966 les textes officiels régissant les principes généraux de la lutte de la brucellose admettent et préconisent la méthode dans le dépistage et la prophylaxie de la maladie.

C. – BASES LÉGALES DE L'ÉPREUVE DE L'ANNEAU :

L'arrêté ministériel du 3 Juin 1966 précise dans son article 19 que pour tous les animaux de l'espèce bovine agés de plus de 12 mois, la recherche des sujets atteints de brucellose latente est effectuée :

– soit par des épreuves de l'anneau sur les prélèvements provenant d'un lait de mélange de 8 vaches au maximum ;

dans le cas de réaction positive à l'une des épreuves les animaux font l'objet d'un prélèvement de sang en vue d'une séro-agglutination ;

dans le cas d'une réaction négative, deux autres épreuves de l'anneau sont pratiquées à intervalle minimum de trois mois et suivies d'une séro-agglutination six semaines après la 2ème épreuve de l'anneau.

– soit par une séro-agglutination suivie dans le cas de réaction négative de la même épreuve 6 mois plus tard.

Elle ajoute dans l'article 34 que les cheptels bovins considérés comme indemnes et officiellement indemnes de brucellose sont contrôlés annuellement par :

– soit 2 séro-agglutinations à 6 mois d'intervalle ;

– soit 3 épreuves de l'anneau effectuées à intervalle d'au moins trois mois ;

– soit 2 épreuves de l'anneau effectuées à intervalle d'au moins trois mois et une séro agglutination pratiquée six semaines au moins après la 2e épreuve de l'anneau.

Lorsqu'un département est soumis à la prophylaxie obligatoire de la brucellose pour tout ou partie de son territoire, si le taux d'infection «n'est pas depuis deux ans au moins supérieure à 1 %» (arrêté ministériel du 22 Décembre 1966), dans le territoire considéré, les opérations de contrôle pourront se limiter annuellement dans les cheptels indemnes ou officiellement indemnes de brucellose à 2 épreuves de l'anneau ou à une épreuve de séro-agglutination.

D.– TECHNIQUE :

L'annexe II de la circulaire ministérielle du 6 Juin 1966 définit les modalités de l'épreuve :

– Prélèvements : l'échantillon doit provenir du mélange de lait de 3 à 8 vaches au maximum, car le Ring Test est en principe une épreuve de diagnostic de petit groupe.

Si l'on désire éprouver le lait d'une seule vache, il convient alors de le diluer au 1/4 dans un lait de mélange reconnu négatif.

– Technique : 1 à 2 ml de l'échantillon de lait sont versés dans un tube à hémolyse ; on y ajoute alors une goutte d'antigène coloré. Le mélange des deux phases est obtenu par renversements successifs du tube qui subit un séjour de 10 à 60 minutes à l'étuve à 37° C.

– Lecture :

Réaction + anneau de crème coloré à la surface du lait, lait sous jacent blanc
= présence d'agglutinines brucelliques.

± anneau de crème et lait sous jacent de même couleur
= présence probable d'agglutinines brucelliques.

– anneau de crème blanc, lait coloré
= pas d'agglutinines brucelliques.

Les résultats ± doivent être considérés comme positifs.

E.– MÉCANISME DU RING TEST :

L'épreuve de l'anneau repose sur les propriétés des globules gras du lait.

Ils constituent en effet des unités corpusculaires dont le diamètre varie de 1,5 à 2 microns, en phase dispersée dans le lait.

Chaque globule comprend :

– un noyau central

– une zone moyenne

– une zone périphérique de nature lipoprotidique. Cette dernière zone comprend la membrane ou «film» formée :

- d'une couche de protéines à groupements hydrophiles et hydrophobes,

- d'une couche de glycérides.

La membrane possède de par sa constitution et son architecture une affinité particulière pour les éléments protidiques du milieu dispersant, et notamment pour les agglutinines spécifiques.

Celles-ci s'adsorbent à la surface des globules gras laissant libres leurs sites actifs sur lesquels viendront se fixer les antigènes colorés.

Le mécanisme du Ring Test repose sur deux principes :

— un phénomène de surface qui assure l'adsorption des agglutinines sur les globules gras.

— une réaction de copulation entre les globulines anti-corps spécifiques adsorbées et l'antigène coloré ajouté au milieu dispersant.

La copule colorée suit donc le globule gras dans son ascension, et l'anneau de crème est plus ou moins coloré (+ à ++++) selon que la réaction est plus ou moins positive.

La réaction antigène-anticorps est plus rapide à 37° C mais l'ascension des globules gras ou «montée de la crème» se fait plutôt à une température comprise entre 10 et 15° C.

F. — INTÉRET DU RING TEST :

a) avantages :

— cette épreuve permet :

1 — le dépistage collectif des effectifs contaminés et l'élaboration de la carte épidémiologique de la maladie dans une région déterminée.

2 — le contrôle des effectifs sains ou assainis.

— c'est une méthode simple, rapide et peu onéreuse.

1 — Simple : les prélèvements à réaliser ne requièrent pas l'intervention d'un personnel spécialisé ; en effet il s'agit de recueillir des échantillons de lait :

- individuels à partir de chaque animal.
- ou collectifs à partir des bidons de ramassage à la ferme ou dans les laiteries.

2 — Rapide : la réaction demande au plus une heure. Elle peut être pratiquée sur place.

3 — Économique : le matériel utilisé est fort réduit (verrerie, portoirs réactifs colorés, l'étuve n'est pas indispensable).

— L'épreuve de l'anneau est d'une grande sensibilité ; elle est capable de déceler la présence d'anticorps brucelliques même à des dilutions très élevées.

— En outre le Ring Test peut révéler les localisations mammaires de la brucellose, très dangereuses sur le plan médical, et cependant quelquefois non révélées par la SAW.

— Ses applications sont variées :

Le Ring Test peut être utilisé avec d'autres produits que le lait.

Ainsi l'on peut diluer, en proportions connues, un exsudat placentaire ou même un sérum dans un lait négatif et pratiquer l'épreuve selon le protocole usuel.

Si l'exsudat ou le sérum contiennent des agglutinines, elles s'adsorbent sur les globules gras du lait négatif diluant, et l'addition d'antigène coloré révèle leur présence comme dans la réaction classique.

b) inconvénients :

— répétition des épreuves : il est nécessaire de pratiquer plusieurs épreuves au cours de la même année, car les femelles laitières d'un troupeau ne sont pas toutes en période de production au moment du premier prélèvement et certains individus échappent donc au contrôle.

— réactions non spécifiques : le colostrum, les laits de fin de lactation, de rétention, les laits altérés, les laits de mammite ou ceux dont le pH est trop acide, faussent les résultats de l'épreuve, en donnant lieu à des réactions non spécifiques.

EXPÉRIMENTATION

Le but de notre travail est de contribuer à l'appréciation de la valeur du Ring Test dans le dépistage de la brucellose bovine.

Nous avons étudié cette épreuve en tant que test collectif et individuel ; et les résultats obtenus ont été comparés à ceux des sérodiagnostics de WRIGHT effectués pour chaque femelle d'un troupeau.

Nous avons recencé 34 exploitations choisies pour les motifs suivants :

— vente de lait cru

— contrôles sérologiques d'achat positifs

— avortements répétés

— arrêté d'infection actuel ou passé pour brucellose légalement contagieuse.

A.— PROTOCOLE D'ACTION = PRÉLEVEMENTS-ÉPREUVES

1 — A la ferme sont prélevés le même jour :

— un échantillon de sang de chaque vache laitière (en lactation ou non) recueilli dans un tube de 20 ml.

— un échantillon de lait de chaque vache en lactation recueilli à partir des 4 quartiers dans un flacon individuel de 20 ml.

— tubes et flacons correspondants sont étiquetés selon le numéro d'identification sanitaire de l'animal.

2 — Au laboratoire :

Tous les prélèvements sont conservés au réfrigérateur à + 4° C.

Les épreuves étant pratiquées au plus tard le lendemain de la collecte, nous n'avons jamais utilisé d'agents conservateurs pour le lait.

Ces épreuves consistent en :

— une séro-agglutination lente de WRIGHT pour chaque sérum récolté. L'inventaire sérologique du troupeau, associé aux commémoratifs concernant l'exploitation permet d'en déterminer le niveau sanitaire (présumé indemne, suspect ou infecté).

— un Ring Test sur le sérum dilué du 10e au 640e dans un lait de mélange négatif (FARINA et BIGGI 1953 Emploi du sérum dilué avec du lait et de l'antigène coloré au tétrazolium dans le diagnostic de la brucellose).

— un Ring Test sur le lait de mélange de 5 à 6 vaches réalisé avec les échantillons à parties égales (l'expérience montre en effet que si la quantité de lait prélevée sur chaque femelle n'est pas approximativement identique, les résultats du Ring Test varient de 0 à +).

— un Ring Test sur ce même lait de petit mélange dilué au 1/5e dans un lait reconnu négatif (cette épreuve représente un Ring Test sur un lait de grand mélange).

— un Ring Test individuel sur le lait de chaque vache.

— un Ring Test individuel sur le même échantillon dilué au 1/5e dans un lait négatif.

— une déviation du complément dans certains cas où sont apparues des discordances entre les différentes épreuves.

B. — TECHNIQUES :

1 — Les séro-agglutinations de WRIGHT :

— Répartition des sérums dans les tubes à hémolyse

— Centrifugation

— Préparation de portoirs à 7 tubes (un portoir par sérum à tester).

— Distribution du liquide de dilution : (nous avons utilisé de l'eau salée à 5 % pour éviter les phénomènes de zone) 0, 8 ml dans le premier tube, 0, 5 ml dans les suivants.

— Distribution des sérums à raison de 0, 2 ml dans le premier tube de chaque portoir.

— Mélange du sérum et du liquide de dilution dans le premier tube.

— Report de 0, 5 ml du mélange dans le deuxième tube et ainsi de suite jusqu'au 7e dont on rejette 0, 5 ml.

— Distribution de 0, 5 ml d'antigène dans chaque tube. Nous avons utilisé l'antigène de Montpellier préparé à partir de la souche brucella Abortus 99 et agglutiné à 50 % (++) par l'étalon international de sérum antiabortus à la dilution de 1/640e.

A chaque série de réaction, on ajoute un tube témoin contenant 0, 75 ml d'eau salée + 0, 25 ml d'antigène ce qui équivaut à une clarification à 50 % (++) du milieu.

— Séjour des tubes 18 heures à l'étuve à 37° C.

— Lecture : selon la densité optique du liquide surnageant

++++ Agglutination complète-clarification complète du liquide surnageant

+++ Agglutination à peu près complète-clarification du surnageant à 75 %

++ Agglutination marquée, et clarification égale à 50 %

+ Agglutination légère et clarification à 25 %

0 Absence totale d'agglutination et de clarification

Le dernier tube où la clarification est égale à 50 % (référence au tube témoin) indique le titre final du sérum étudié, exprimé en unité. internationales.

2 — Ring Tests :

a) l'antigène coloré :

Nous avons utilisé le «lacto-bang» de l'Institut Pasteur, coloré à l'hématoxyline. Il confère à l'anneau de crème une teinte bleu violet lors de réaction positive.

Il est préparé à partir de la souche brucella, Londres 99 en phase S., selon le protocole suivant :

— culture en fermenteurs dans un bouillon nutritif tamponné à pH 7,2 - 7,3.

Incubation à 37° C pendant 48 heures

Contrôle de pureté, de phase S et de densité microbienne.

Centrifugation et stérilisation au bain marie à 60° C pendant une heure.

Les culots sont lavés à l'eau distillée puis mis en suspension dans un faible volume d'eau distillée.

— Coloration :

- Préparation du colorant : mélange de glycérol, d'une solution d'alun d'ammonium et d'une solution alcoolique d'hématoxyline. Oxydation du mélange par une solution d'iodate de sodium ou de potassium pendant quelques minutes.

L'hématoxyline est alors transformée en hématéine.

- Addition de la suspension de brucella. Le tout est porté au bain marie à 80° C pendant 20 minutes puis centrifugé. Après refroidissement, les culots sont remis en suspension concentrée en soluté physiologique à 0, 85 % de NaCl additionné de 1 % de phénol.

- Étalonnage en séro diagnostic lent en tubes et sur du lait en utilisant un sérum contenant 1000 UI ml.

b) manipulations sur les laits :

— constitution des laits de petit mélange (5 à 6 vaches). De 5 à 6 flacons individuels provenant d'un même troupeau, est prélevé 1 ml de lait.

Ces 5 à 6 ml sont recueillis dans un nouveau flacon, étiqueté selon les numéros correspondants.

— dilution au 1/5^{e} des laits individuels et des laits de petit mélange à raison de 0, 5 ml dans 2 ml de lait reconnu négatif.

— distribution des laits à tester (individuels et collectifs, dilués ou non) dans des tubes à hémolyse à raison de 2 ml par tube (la hauteur de la colonne de lait est environ de 3 cm et permet d'apprécier aisément la formation de l'anneau).

— addition de l'antigène coloré (1 goutte soit 0, 05 ml pour 1 ml de lait).

— mélange des deux phases par renversements successifs des tubes.

— séjour à l'étuve 15 minutes à 37° C pour favoriser l'interaction antigène coloré-globuline anticorps.

— lecture une heure après la sortie de l'étuve.

Nous avons adopté le tableau de lecture suivant :

0 anneau de crème blanche — colonne de lait colorée.

± crème et lait approximativement de la même couleur.

+ crème formant un anneau légèrement coloré — lait non décoloré.

++ crème formant un anneau plus coloré que le lait.

+++ crème formant un anneau nettement plus coloré que le lait.

++++ anneau très coloré — lait entièrement décoloré.

c) Ring Test sur le sérum :

— préparation de portoirs à 7 tubes (1 portoir par sérum à étudier).

— distribution du liquide de dilution (lait de mélange reconnu négatif au Ring Test) à raison de 1, 6 ml dans le premier tube et 1 ml dans les autres.

— distribution des sérums à étudier, 0, 4 ml dans le premier tube de chaque portoir.

— mélange du sérum et du liquide dilution dans le premier tube.

— report de 1 ml du mélange dans le deuxième tube et ainsi de suite jusqu'au septième tube dont on rejette 1 ml.

— addition de 1 ml de lait de mélange négatif dans chaque tube.

— distribution de l'antigène coloré, une goutte dans chaque tube. (Une expérimentation annexe nous a permis d'établir qu'une goutte d'antigène coloré par 2 ml correspond à 0, 5 ml d'antigène de Montpellier dans la SAW).

Les taux de dilution du sérum dans le lait sont donc de 1/10^{e}, 1/20^{e}, 1/40^{e}, etc... jusqu'au 1/640^{e}.

— séjour à l'étuve de 37° C pendant 15 minutes.

— lecture une heure après la sortie de l'étuve.

Pour chaque dilution on apprécie la réaction de 0 à ++++. Le dernier tube où la réaction est au moins ++ marque le degré de positivité du sérum exprimé en UI.

Tableau N° 1
RÉSULTATS DU RING TEST COLLECTIF NON DILUÉ

N° d'étables	RT = 0	RT = ±	RT = +	RT = ++	RT = +++	RT = ++++	Etat sanitaire	Nbres RT collectifs
1	0						Etables ou la séro est inférieure à 30 U.I.	1
2		0	15					2
3	25							1
4		0						1
5	23	15						2
6	0	23						2
7		18						1
8	18							1
9		23						1
10	15							1
11	18	0						2
12		0	15					2
13	0	23						2
14		0		0	23			3
15		23 ; 18 ; 39	47				Sérologie comprise entre 30 et 80 U.I.	4
16			47 ; 18					2
17	0 ; 18	39						3
18	23		39					2
19						1500	Sérologie supérieure à 80 U.I.	1
20						1500		1
21		23				94		2
22						750 - 1500		2
23		18 ; 23	62	188				4
24						375, 750, 1000, 1500		4
25						500		1
26					156-750	1500		3
27					156	1500		2
28					1250			1
29	23 ; 0	39				750 - 375		5
30				1000, 1500		1500		3
31	156							1
32					625	1500		2
33				625				1
34						750		1

C. – RÉSULTATS :

1 – ÉTUDE DU RING TEST COLLECTIF.

a) Ring Test collectif (non dilué). (Tableau n° 1)

Le tableau relate les résultats des Ring Tests collectifs effectués dans 34 exploitations que l'inventaire sérologique a permis de répartir en 3 catégories :

– 14 étables (numéros 1 à 14), présumées indemnes (sérologie inférieure à 30 UI).

– 4 étables (15 à 18) suspectes (sérologie comprise entre 30 et 80 UI).

– 16 étables (19 à 34) infectées (sérologie supérieure à 80 UI).

Selon le nombre de laitières en présence ont été réalisés dans chaque étable 1 à 5 Ring Tests collectifs groupant 3 à 6 vaches dont le séro diagnostic individuel est établi.

Horizontalement sont portés les degrés de positivité du Ring-Test.

Verticalement les numéros des exploitations recensées.

Dans la case correspondant au résultat du Ring Test d'un lot figure le titre agglutinant le plus élevé du lot exprimé en unités internationales.

Exemple : l'étable n° 16 a donné lieu à 2 Ring Tests collectifs dont les résultats sont + ; la séro agglutination la plus marquée parmi les animaux du premier lot est de 47 UI, elle est de 18 UI parmi ceux du 2e lot.

Interprétation du tableau n° 1 :

– Le Ring Test collectif ne permet pas de distinguer les effectifs présumés indemnes (moins de 30 UI) des effectifs douteux (30 à 80 UI). En effet, pour ces deux catégories les réponses oscillent entre 0 et +.

– Elles vont par contre de ++ à ++++ pour les troupeaux infectés où certains individus agglutinent à plus de 80 UI.

– Que la sérologie du troupeau soit ou non supérieure à 80 UI, on observe un certain parallélisme entre le titre agglutinant le plus élevé d'un lot et le résultat du Ring Test de ce lot.

Néanmoins, on ne peut établir un rapport direct entre eux car des discordances apparaissent.

Ainsi, parmi les effectifs présumés indemnes et les douteux ce titre peut être :

de 47-39 ou même 15 UI (étables numéros 15-18 et 2) pour un même résultat + du Ring Test collectif.

ou de 0 ou 25 UI pour un Ring Test négatif (étables numéros 1 et 3).

Et parmi les effectifs infectés, l'on trouve un Ring Test ++ pour 188 UI (étable numéro 23) alors qu'il est ++++ pour 94 UI (étable numéro 21).

— Il n'existe pas de relation entre la réponse du Ring Test collectif et celle des Ring Tests individuels des laits composant la collection. Cependant pour que le Ring Test collectif accuse un ±, il faut qu'au moins un des laits composants, ait un Ring Test individuel ++, ce qui ne correspond pas nécessairement à une SAW supérieure à zéro.

Cas particuliers :

— Étable n° 14 : 2 résultats semblent discorder. Le Ring Test accuse un ++ pour zéro UI et +++ pour 23 UI. Il convient de préciser que lorsque les prélèvements furent faits sur les animaux de ce troupeau, 3 femelles agglutinant à plus de 100 UI/ml venaient d'être éliminées par leur propriétaire.

Il s'agit donc d'une étable en voie d'assainissement. L'on peut penser que certaines femelles testées souffrent d'une infection brucellique localisée à la mamelle et que les agglutinines ne sont pas encore apparues dans leur sérum.

— Étable n° 30 à 34 : les échantillons de laits collectifs n'ont pas été réalisés avec des proportions égales de laits individuels, selon le protocole adopté pour les autres ; ont été recueillis à l'étable, dans un même flacon, quelques jets de lait de chaque vache. Cette méthode est susceptible d'être à l'origine d'erreurs supplémentaires.

— Étable n° 31 : Ring Test 0 pour SAW 156 UI , citons à ce propos la remarque de P. ROSSI selon laquelle «20 % au moins des vaches sûrement infectées et dont la teneur du sérum oscille de 78 à 156 UI n'ont pas dans leur lait des agglutinines en quantité notable».

b) Ring Test collectif dilué au 1/5e dans un lait négatif.
(Tableau n° 2).

Cette épreuve correspond à un Ring Test sur un lait de grand mélange. Elle n'a été réalisée que pour la moitié des étables recensées.

On constate :

— que si, dans un lot d'animaux, le titre agglutinant individuel ne dépasse pas 80 UI, la réponse du Ring Test va de 0 à ±.

Ici, encore, l'on ne peut faire la distinction entre les troupeaux présumés indemnes et les troupeaux suspects.

— que lorsque le titre dépasse 80 UI, les réactions du Ring Test s'étendent de ++ à ++++.

— que les erreurs par excès du tableau n° 1 (Ring Test collectif non dilué) disparaissent, et d'une façon générale, les réponses du Ring Test collectif dilué s'estompent d'un à deux degrés, par rapport à celle du Ring Test collectif non dilué pour les lots dont aucun sujet n'agglutine à plus de 80 UI. (Les ± et + deviennent 0).

Ces mêmes réponses sont cependant aussi marquées (++ à ++++) pour les lots où l'agglutination individuelle est supérieure à 80 UI.

Tableau N° 2

RÉSULTATS DU RING TEST COLLECTIF DILUÉ AU 1/5e

N° d'étables	RT = 0	RT = ±	RT = +	RT = ++	RT = +++	RT = ++++	Etat sanitaire	
9	23						Etables où la Sérologie est inférieure à 30 U.I.	1
10	15							1
11	0, 18							2
12	15	0						2
13	0, 23							2
14	0, 23, 0							3
15	18, 23, 39, 47						Sérologie comprise entre 30 et 80 U.I.	4
16		47, 18						2
17								
18	39, 23							2
19						1500	Sérologie supérieure à 80 U.I.	1
20						1500		1
21		23				94		2
22						750, 1500		2
23		18, 23, 62		188				4
24						375, 750,1000. 1500		4
25						500		1
29	0, 23	39				375, 750,		5

Conclusion générale :

— Une réaction ++ à ++++ sur des laits de petit ou de grand mélange permet d'affirmer avec une quasi certitude la présence de femelles brucelliques au sein d'un effectif.

— Mais une réaction ± ou + ne peut, en aucun cas, permettre d'affirmer à elle seule que le troupeau éprouvé est indemne de brucellose.

— Une réaction négative du Ring Test sur lait de petit mélange semble signifier qu'au sein du lot examiné aucune laitière ne dépasse les 30 UI agglutinantes.

Mais les réactions négatives du Ring Test sur lait de grand mélange réunissent des lots d'animaux où le titre le plus élevé est de 18, et des lots où il est de 47. Elles ne peuvent donc attester de la non infection de l'étable éprouvée.

2 — ÉTUDE DU RING TEST INDIVIDUEL

Le Ring Test collectif nous a permis de classer avec un très faible pourcentage d'erreurs les étables testées en deux catégories :

— présumées indemnes et suspectes

— infectées.

Nous avons donc réuni les résultats de nos épreuves individuelles en deux tableaux (n° 3 et 4).

Le tableau n° 3 relate les réponses de 91 Ring Tests et SAW individuels réalisés dans 9 exploitations (6 présumées indemnes n° 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, et 3 suspectes n° 15, 16 et 18).

Le tableau n° 4, celles de 105 Ring Test et SAW individuels réalisés dans 8 exploitations infectées (n° 19 à 25 et 29).

En horizontale y sont portés les titres agglutinants des sérums analysés.

En verticale, le degré de positivité du Ring Test individuel effectué sur les laits correspondants.

Chaque case est donc définie par deux paramètres (Ring Test et SAW).

Y figurent deux chiffres :

en haut, le nombre d'échantillons de lait entier répondant aux caractéristiques de la case ;

en bas, celui des mêmes échantillons dilués au 1/5^{e} répondant aux mêmes caractéristiques.

Dans les colonnes de droite et du bas figurent les totaux.

Exemple : Dans la case située en haut et à gauche :

37 animaux dont le Ring Test individuel sur le lait entier et la séro agglutination ont donné une réponse négative,

38 animaux dont le Ring Test individuel dilué au 1/5^{e} et la SAW ont un résultat négatif.

Selon les directives de la circulaire ministérielle du 14 Juin 1966, lorsque dans un effectif bovin, aucune réaction ne dépasse le taux de 80 UI agglutinantes, chez les animaux autres que les génisses vaccinées, les séro agglutinations comprises entre 30 et 80 UI, ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer l'infection ; les sérums ayant

donné de tels titres, seront alors soumis à l'épreuve de déviation du complément ou à la réaction à l'antiglobuline.

Nous admettrons, pour interpréter nos résultats, selon cette appréciation officielle, qu'une réponse 0 ou ± du Ring Test individuel est donné par une femelle dont le taux d'agglutination sérique est inférieur à 80 UI, et une réponse + à ++++, par une femelle dont le taux dépasse 80 UI.

A — Interprétation du tableau nº 3 (étables dont l'inventaire sérologique ne dépasse pas 80 UI).

1 — Ring Test individuel non dilué : 91 échantillons, réponses de 0 à +++.

Erreurs par excès : 26 (14+, 6++, 6+++) soient 28, 51 %.

La plupart de ces erreurs disparaissent lorsque les échantillons sont dilués au 1/5e.

L'on est donc en droit de penser qu'elles tiennent aux variations individuelles de la composition physico-chimique du lait. En effet la teneur en matières grasses et en globulines est différente selon qu'il s'agisse de lait de fin de traite ou de lactation, de lait de rétention ou de lait altéré. La dilution atténue ces variations individuelles.

2 — Ring Test individuel dilué au 1/5e : les 91 réponses s'échelonnent de 0 à ++.

Erreurs par excès : 7 (4+ et 3++) soient 7, 70 % c'est-à-dire 4 fois moins d'erreurs qu'avec la méthode précédente.

Il est probable qu'un Ring Test positif révèle parfois des anticorps non spécifiques contenus dans le lait comme le fait parfois la SAW pour le sérum.

Ce sont des épreuves de déviation du complément effectuées sur les sérums correspondants à ces échantillons de lait qui nous ont permis d'émettre cette hypothèse (ex. SAW : 15 UI ; déviation du complément négative, Ring Test ++).

Tableau N° 3

RÉSULTATS DU RING TEST INDIVIDUEL DANS LES ÉTABLES OU LA SÉROLOGIE NE DÉPASSE PAS 80 UI

(91 échantillons)

RT \ SAW (UI)		0	15	18	23	31	39	47	62	TOTAL
0	entier	37	2	5	4					48
	1/5e	38	3	4	7					52
±	entier	11	1	1	3			1		17
	1/5e	18		5	4		3	2		32
+	entier	7		1	3		2	1		14
	1/5e	2		1		1				4
++	entier	2		3		1				6
	1/5e	2	1							3
+++	entier	3	1		1		1			6
	1/5e									
++++	entier									
	1/5e									
TOTAL	entier	60	4	10	11	1	3	2		91
	1/5e	60	4	10	11	1	3	2		91

Tableau N° 4

RÉSULTATS DU RING TEST INDIVIDUEL DANS LES ÉTABLES OU LA SÉROLOGIE DÉPASSE 80 UI (105 échantillons)

RT \ SAW U.I.	0	15	18	23	31	39	47	62	94	125	188	312	375	500	625	750	1000	1500	TOTAL
0	16	1	1	3	1	1	3	1			1								28
	12	1		2	1	2	1	1			1								21
+ −	10		1	2	3		2												18
	15	1	4	7	2		2												31
+	4	1	3	5		2			1	1	1					1			19
			1	2	1	1	2		2		2								11
++	1			3		2		1	2		3		3			1		1	17
	5					1		1		1			2						10
+++	1						1		1		3	1	2						9
				1		1	1		2	1	5	1	4			2		2	20
++++									1	1			3	1	2	2	1	3	14
				1					1				2	1	2	2	1	2	12
TOTAL	32	2	5	13	4	5	6	2	5	2	8	1	8	1	2	4	1	4	105
	32	2	5	13	4	5	6	2	5	2	8	1	8	1	2	4	1	4	105

B — Interprétation du tableau nº 4 (étables dont l'inventaire sérologique dépasse 80 UI).

1 — Ring test individuel non dilué : 105 échantillons.

a) Erreurs par excès (sur les 69 animaux agglutinant à moins de 80 UI) : 24 (15+, 7++, 2+++) soient 34, 81 %.

b) Erreurs par défaut (sur les 36 animaux agglutinant à plus de 80 UI) : 1 (Ring Test négatif) soit 2, 77 %.

2 — Ring Test individuel dilué :

a) Erreurs par excès (sur les 69 animaux agglutinant à moins de 80 UI) : 18 (7+, 7 ++, 3 +++, 1 ++++) soient 26, 08 % c'est-à-dire 1/4 de moins d'erreurs qu'avec la méthode précédente.

b) Erreurs par défaut (sur les 36 animaux agglutinant à plus de 80 UI) : 1 (Ring Test négatif) soit 2, 77 %.

Il convient donc de diluer les échantillons comme le recommande l'annexe II de la circulaire ministérielle du 19 Juillet 1966 pour utiliser l'épreuve de l'anneau à titre individuel, car cet artifice diminue notablement le nombre d'erreurs par excès.

Les erreurs par excès sont plus nombreuses dans les étables infectées que dans les étables indemnes ou douteuses.

Hypothèses :

— Les «apparentes» erreurs par excès du Ring Test individuel :

- Il ne faut pas oublier que ces Ring Tests individuels ont été réalisés sur des femelles appartenant à des effectifs infectés de brucellose. L'on est en droit, dans de telles circonstances, d'émettre des réserves devant un résultat positif de l'épreuve de l'anneau concernant une femelle dont le titre agglutinant peut être considéré comme négatif : il peut s'agir dans ce cas d'une infection brucellique de la mamelle. Cet organe est riche en cellules du système réticulo-endothélial et la concentration des lacto-agglutinines est donc beaucoup plus élevée que celles des séro-agglutinines : le Ring Test est positif, la SAW restant négative (ainsi le résultat Ring Test ++++ pour 23 UI SAW, a une déviation du complément positive).

- Par ailleurs les agglutinines sériques subissent dans l'organisme infecté des oscillations passagères au moment de la mise bas et des oscillations de longue durée au cours de l'évolution du processus morbide.

A la phase initiale de septicémie, succède une phase de localisation ouverte du bacille à la mamelle ou à l'utérus, durant laquelle on observe la présence d'anticorps circulants (SAW et Ring Test sont alors positifs). Puis, survient une phase de localisation fermée du bacille au niveau des ganglions ; les anticorps circulants disparaissent (P. ROSSI). S'il s'agit de ganglions mammaires on risque d'avoir un Ring Test + pour une SAW —.

- Enfin, le Ring Test ne révèle-t-il pas des anticorps autres que les agglutinines et en particulier des anticorps incomplets.

Le globule gras jouerait alors le rôle de l'antiglobuline d'espèce de la réaction de COOMBS, et permettrait la réunion des complexes antigène coloré-anticorps incomplets visualisés dans l'anneau coloré.

— Les défauts du Ring Test individuel dans les étables infectées.

Ils concernent pour la plupart des animaux vaccinés à la souche B 19, pour lesquels la SAW est fortement positive et le Ring Test négatif ou faiblement positif (CF tableau n° 4) :

une vache vaccinée à la souche B 19 agglutinine à 188 UI pour un Ring Test individuel négatif ;

trois vaches vaccinées à la souche B 19 agglutininent respectivement à 94, 125 et 188 UI pour un Ring Test Individuel + soit faiblement positif.

Or, les données de la littérature montrent que la souche B 19 n'infecte pas la mamelle, tandis que les cultures faites à partir des prélèvements réalisés sur le terrain s'adaptent à la mamelle, et que les agglutinines spécifiques, résultant de cette infection, se trouvent en permanence dans le lait des animaux atteints de brucellose.

Les anticorps vaccinaux du lait apparaissent, eux, 12 à 14 jours après l'inoculation et disparaissent 1 mois et demi à 2 mois plus tard. (F.D. LOKTEVA et G. SIMENTZIS).

3 — ÉTUDE DU RING TEST SÉRUM (Tableau n° 5).

En abscisses sont portés les titres agglutinants des sérums, mesurés par l'épreuve du Ring Test selon le protocole décrit précédemment (0, 05 ml d'antigène coloré pour 2 ml de mélange lait-sérum).

En ordonnée, les titres agglutinants des mêmes sérums à l'épreuve de WRIGHT (0, 5 ml d'antigène de Montpellier pour 1, 5 ml de sérum et hypersalé à 5 %). Les deux épreuves définissent les coordonnées d'un sérum, matérialisé par un point sur le graphique.

Le chiffre inscrit à proximité d'un point représente le nombre de sérums dont les caractéristiques répondent à ce point.

La courbe imaginaire de concordance des 2 épreuves est tracée sur le graphique. L'idéal serait qu'elle regroupât tous les points.

Étude du graphique : 129 Ring Test sérums et 129 SAW correspondantes.

79 épreuves de la SAW compris entre 0 et 30 UI :

22 excès que le RTS a classés entre 30 et 80 UI,
2 excès que le RTS a classés à plus de 80 UI,
soient 24 excès c'est-à-dire 30,37 %.

14 épreuves de SAW comprises entre 30 et 80 UI :

2 défauts classés à moins de 30 UI pour le RTS.

36 épreuves de SAW au-delà de 80 UI :

5 défauts classés entre 30 et 80 UI pour le RTS.

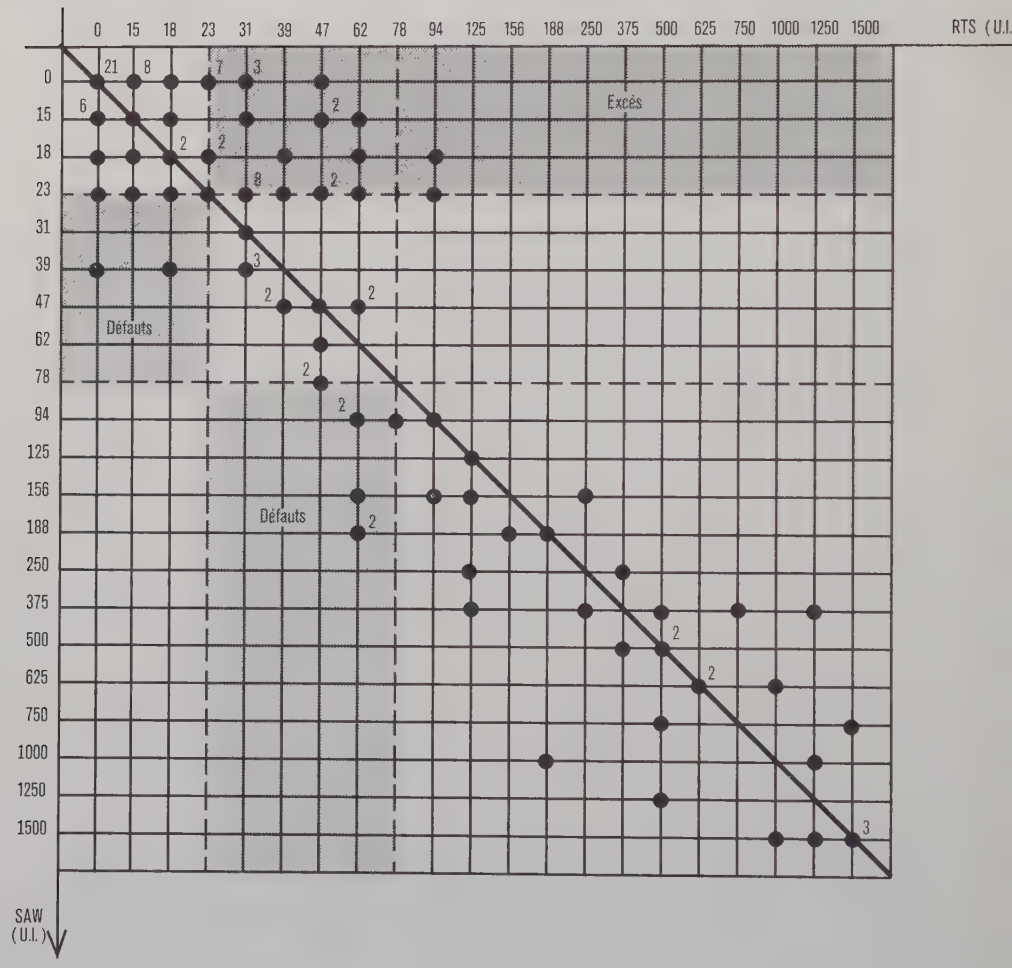
C'est-à-dire au total 7 défauts, soient 14 %.

Si l'on considère que les résultats du RTS compris entre 30 et 80 UI doivent être classés parmi les positifs, il n'existe plus que 2 défauts sur les 50 épreuves de SAW dépassant 30 UI, soit 4 %.

— Intérêt : il tient à la simplicité et à la rapidité du procédé qui permet d'apprécier avec une bonne approximation le titre agglutinant d'un sérum en moins de deux heures.

— Critique : cette méthode semble surtout pêcher par excès. Mais, il existe plusieurs types d'immunoglobulines anti-brucelliques et l'on peut penser que celles responsables de la séro-agglutination ne sont pas les mêmes que celles que révèle la réaction de fixation du complément.

Tableau N° 5
ÉTUDE DU RING TEST SÉRUM (129 échantillons)



Si l'on veut bien considérer que les globules gras du lait adsorbent toutes ces immunoglobulines sériques, il faut admettre que le Ring Test appliqué au sérum peut révéler aussi bien les anticorps agglutinants que ceux fixant le complément, ou que les anticorps dits incomplets.

C'est ainsi qu'un sérum SAW 1/10e ++++ ou 1/20e + inférieur ou égal à 30 UI , peut donner :

— une déviation du complément +

— une réaction positive au Ring Test pratiqué sous forme quantitative sur le sérum.

RING TEST — COUT DE L'INTERVENTION

Pratiquée dans la région du Sud-Ouest par un agent technique. Région de petites exploitations rapprochées — moyenne de cheptel bovin 9 à 11 bêtes par étable.

Troupeau bovin moyen 150.000 à 200.000 têtes.

On peut estimer après expérience qu'un tel agent peut assurer le dépistage dans 20 à 30 exploitations par journée de travail.

TARN 81 — 13.000 exploitations — 150.000 bovins
moyenne 10,4 bovins par exploitation.

Kilomètre moyen par exploitation : 4 Kms, 720

Kilomètre moyen par vache : 450 mètres soit en chiffre arrondi **5 kms par exploitation.**

Frais de déplacement voiture : repas de midi compris **30 à 35 centimes par vache.**

Frais de matériel : flaconnage (300 flacons individuels par jour)
bouchons, étiquettes, tubes, etc... (60 tubes réaction Ring Test par jour)

Frais de réactif : **antigène** — 1 flacon de 10 ml fait en réalité 100 à 120 gouttes donc 100 à 120 réactions Ring Test).
prix : 5, 25 le flacon.

Dépense : 2 gouttes par exploitation, soit à l'excès 100 gouttes pour **un flacon par jour.**

C'est-à-dire 5 centimes par vache.

EN CONCLUSION : un dépistage Ring Test revient à 50 centimes par femelle.

Ce chiffre doit être multiplié par 2 ou par 3 suivant le rythme de répétition du contrôle massal (2 ou 3 contrôles successifs).

CONCLUSIONS

— L'épreuve du Ring Test est avant tout une méthode de diagnostic de petit groupe (8 animaux).

Cependant elle semblerait plus spécifique sinon moins sensible pour le diagnostic d'effectifs plus importants (15 à 30 vaches environ).

Quoiqu'il en soit, si le test de l'anneau peut révéler, avec une marge d'erreurs minime, l'infection brucellique au sein d'un troupeau, elle est par contre incapable d'attester de l'intégrité sanitaire d'un cheptel, les lots d'animaux présumés indemnes et douteux donnant une même réponse 0 à +.

Elle permet donc d'établir dans une contrée, la liste des étables où sévit la brucellose, néanmoins pour toutes les exploitations recensées, il sera indispensable de pratiquer des prélèvements de sang individuels pour assurer un séro-diagnostic qui parfaira le dépistage.

— L'utilisation du Ring Test au titre de diagnostic individuel nécessite obligatoirement la dilution de l'échantillon à analyser afin de tempérer les erreurs dues aux différences de composition physico-chimique de chaque lait.

— Appliqué au sérum, le Ring Test trouve une nouvelle dimension. Dans la mesure où il révèle vraiment, comme nous en avons émis l'hypothèse, les différents anticorps antibrucelliques contenus dans un sérum, il présente un intérêt certain dans le dépistage individuel de la maladie.

D'une manière générale, le dépistage Ring Test montre que les erreurs par excès, si elles sont importantes, permettent parfois de découvrir des brucelloses latentes, dans des étables où les manifestations de la maladie n'existent pas ou n'existent plus.

Il n'est donc pas grave que cette épreuve pêche par excès.

En ce qui concerne les erreurs par défauts, elles peuvent être palliées :

1) par la répétition des Ring Tests,

2) par l'association d'autres épreuves immunologiques (SAW, déviation du complément, test de COOMBS, immunofluorescence).

3) par la prise en considération des commémoratifs établis par les praticiens, car le laboratoire doit toujours rester lié à la clinique et toute discordance entre l'état sanitaire suspect d'un effectif, et un résultat négatif à l'épreuve de l'anneau, par exemple, doit obligatoirement entraîner un inventaire sérologique pour l'établissement d'un diagnostic immunologique.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

P. SAURAT

Vu : Le Directeur de l'Ecole
Vétérinaire

R. FLORIO

Vu : Le Président de la Thèse

Mme ENJALBERT

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 16 Mars 1972

LE PRÉSIDENT
de l'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER

L. LARENG

BIBLIOGRAPHIE

ANDRIEU : Aspect actuel des Brucelloses humaines. (Revue Vétérinaire 1965 Tome CXVI 10, 701)

ALTON G.G. et LOIS M. JONES : La Brucellose, Technique de Laboratoire (O.M.S. Genève 1968)

BELLON Ph. : Notions épidémiologiques sur la zoonose brucellique. (Thèse de Doctorat Vétérinaire 1967)

BENTSEN : Comparaison entre le Ring Test et la séro agglutination dans le diagnostic de la brucellose. (Thèse Copenhague 1952).

BERTHELON et ROYAL : Recherche des Moyens propres à éviter les défaillances de l'épreuve de l'anneau dans les opérations de dépistage (Revue Vétérinaire Toulouse Mars 1968 p. 201).

BERTHELON : Essai de prophylaxie de la brucellose bovine. (Revue Vétérinaire, Toulouse 1965 p. 497)

BERTHELON et LAFENETRE : Diagnostic de la brucellose chez les animaux domestiques. (Office International des Epizoonoses Tome L Mai 1958 p. 123)

CAMY M. : Brucellose Expérimentation de la vaccination antibrucellique (Bull. Soc. Vét. Prat. Mai 1969 p.229)

CAMY M. : Brucellose, diagnostic et police sanitaire Résultats étude statistiques. (Bull. Soc. Vét. Prat. de France. Novembre 1968)

FARINA et BIGGI : (1953) Emploi du sérum dilué avec du lait et d'antigène coloré au tétrazolium dans le diagnostic de la brucellose. (Zooprofilassi 8, pages 569-572)

LAFENETRE : Intérêt actuel de la brucellose et difficultés de sa prophylaxie. (Revue Vétérinaire Toulouse Octobre 1965)

LOKTEVA F.D. : Différenciation des réactions sérologiques postvaccinales par l'examen du lait à l'aide de la réaction d'agglutination chez les vaches vaccinées avec le vaccin de souche B 19. (Bull. Off. Int. Epizzo. 1965 63 (7-8), 1055-1064.

MATHIEU : Les modalités de la lutte antibrucellique dans l'espèce bovine 1969.

MORRE Thomas : The Brucella abortus Ring Test. (Canadian jour. of Comp. Méd. 1951 XV p. 39-46.

OTTENSEN H.E. : Diagnostic des brucelloses animales. (Off. int. Epizzo. Tome L Mai 1958 p. 94.

PILET Ch. et BOURDON J.L. : Sur la transmission des brucelloses animales à l'homme. (Les Cahiers de Médecine Vétérinaire 1965 Vol. XXXIV, I, pp. 3 à 21).

PILET et THOMAS : Les techniques de séro agglutination dans le diagnostic de la brucellose. (Les Cahiers de Médecine Vétérinaire Janvier-Février 1969 Vol. XXXVIII N° 1)

PLOMMET M. : Origine des anticorps du lait. (Ann. Bio. Anim. Bioch. Biophys. 1968, 8, 407.)

Quatrième rapport du Comité Mixte FAO.OMS d'experts de la Brucellose. (Org. Mon. Santé, Ser. Rapp. Techn. 1964 289)

RENOUX G., Alain PHILIPPON et Michel PLOMMET : Valeur des faibles titres agglutinants pour le diagnostic de la brucellose bovine. (Bull. Acad. Vét. Tome XLI Novembre 1968)

RENOUX G. et GAUMONT R. : Méthodes de diagnostic biologique des brucelloses animales. (Les Cahiers Techniques du Centre National de Coordination des Etudes et des Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation. (XII Pathologie de la production lait II 1966 p. 27)

ROSSI Paul : L'épreuve de l'anneau Abortus-Bang Ringprobe (A.B.R.) ou Ring Test (R.T.) dans la brucellose bovine. (Recueil de médecine vétérinaire 1952 p. 128, 285)

ROSSI Paul : Prophylaxie de la brucellose bovine. (Bull. de l'Off. Int. des Epizzo. 44 p. 301, 312)

ROSSI Paul : Diagnostic expérimental des brucelloses bovines. (Bull. Soc. Vét. Lyon 1948 n° 5 p. 181, 184)

ROUX : Revue hygiène et médecine sociale 1961, 9, p. 522.

SCHOENERS F. et KAERCKENBEECK A. : A propos du diagnostic de la brucellose bovine. (Ann. Méd. Vét. 1958 CII, 3)

SENTHILLE F.P. : Application de la méthode du Ring Test au dépistage de la brucellose dans le département de l'Orne. (Bull. Acad. Vét. France 1953, 26, Page 221-227)

SIMENTZIS G. : Technique de laboratoire au diagnostic de la brucellose. (Org. Mond. Santé, Serv.R) Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. Comparée Lyon 65-67.

Troisième Rapport du Comité Mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose. (Org. Mond. Santé. Serv. Rapp. Techn. 1958, 148)

Zoonoses connaissances et techniques nouvelles. (1954 OMS. Monographie 19).

Imp. E. Vicq, Fle